

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Mahovina *Physcomitrella patens* kao modelni organizam u istraživanjima interakcije biljka –
patogen

Moss *Physcomitrella patens* as a model organism in researches of plant – pathogen interaction

SEMINARSKI RAD

Nina Veršević

Preddiplomski studij biologije

Undergraduate Study of Biology

Mentor: Prof. dr. sc. Gordana Rusak

Zagreb, 2014.

Popis kratica

JA	jasmonska kiselina, engl. jasmonic acid
LB	engl. Luria-Bertani
PDA	engl. potato dextrose agar
ROS	reaktivni kisikovi spojevi, engl. reactive oxygen species
SA	salicilna kiselina, engl. salicylic acid
TSWV	virus pjegavosti i venu a raj ice, engl. <i>Tomato spotted wilt virus</i>

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Mahovina <i>Physcomitrella patens</i>	2
3. Interakcije mahovine <i>Physcomitrella patens</i> i patogena.....	4
3.1. Mahovina <i>Physcomitrella patens</i> u interakciji s gljivama.....	4
3.2. Mahovina <i>Physcomitrella patens</i> u interakciji s oomicetama	6
3.3. Mahovina <i>Physcomitrella patens</i> u interakciji s bakterijama.....	8
3.4. Mahovina <i>Physcomitrella patens</i> u interakciji s virusima.....	9
3.5. Metode korištene u istraživanjima interakcije mahovine <i>Physcomitrella patens</i> i patogena (gljiva, oomiceta i bakterija)	10
4. Zaključak	11
5. Literatura	13
6. Sažetak	15
7. Summary	15

1. Uvod

Zahvaljujući evoluciji i zajedničkom porijeklu prokariota, arheobakterija i eukariota, saznanja o biološkim procesima jednog organizma mogu se primijeniti na pojedinim drugim, više ili manje srodnim organizmima. Organizmi koji se intenzivno istražuju u cilju razumijevanja pojedinih bioloških procesa nazivaju se modelni organizmi. Do sada najčešće korišteni modelni organizmi u biološkim istraživanjima su bakterija *Escherichia coli*, pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i cijepajuć i kvasac *Schizosaccharomyces pombe*, sluzava ameba *Dictyostelium discoideum*, obli *Caenorhabditis elegans*, vinska mušica *Drosophila melanogaster*, riba zebrica *Danio Rerio*, zapadni kućni miš *Mus musculus* i talijan uro njak *Arabidopsis thaliana*. Mahovina *Physcomitrella patens* se razmatra kao novi modelni organizam u biološkim istraživanjima, uključujući i istraživanja interakcije biljka – patogen (Ponce de León i sur., 2007.). Koevolucija biljnih patogena i biljaka rezultira mnogobrojnim, različitim mehanizmima za preživljavanje kako od strane patogena tako i od strane biljaka koje su morale razviti u inkovite obrambene mehanizme. Mahovine su prvi kompleksni autotrofni, kopneni organizmi (Nikolić, 2013.) i kao takvi morali su se prilagoditi novim uvjetima i razviti nove mehanizme obrane od patogena. Mahovina *P. patens* u interakciji s patogenima pokreće obrambene mehanizme slične obrambenim mehanizmima kritosjemenjaka (Ponce de León, 2011.). Jednostavan uzgoj *in vitro* (Ponce de León, 2011.), jednostavna građa gametofita i protoneme, haploidan gametofit i sekvencioniran genom (Ponce de León i sur., 2012.) olakšavaju istraživanja procesa infekcije patogenima i obrane mahovine od patogena. Nedostatak mahovine *P. patens* kao modelnog organizma je težak uzgoj velike količine mahovine *in vitro* što otežava istraživanja u kojima je potrebna velika količina biljnog materijala (npr. istraživanja signalnih molekula).

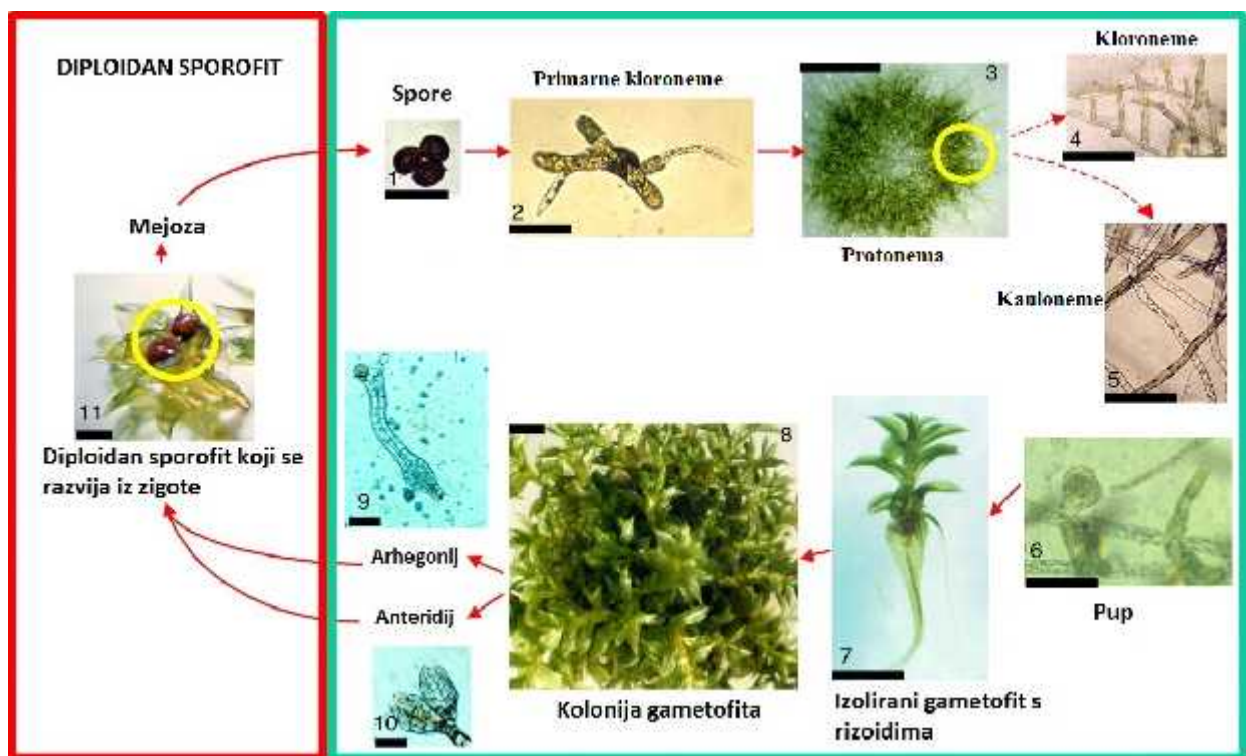
2. Mahovina *Physcomitrella patens*

Mahovine (*Monosporangiophyta*) su skupina višestanih kopnenih biljaka na kojima se sporofitu razvija samo jedan sporangij. Procijenjeno je da su evoluirale prije 420 milijuna godina (Nikoli, 2013.) i poveznicu između zelenih algi i vaskularnih biljaka (Ponce de León, 2011.). Pretpostavlja se da su prvi kompleksni, autotrofni organizmi kopnenih staništa. Mahovine nemaju diferenciran pravi kormus, kao ni provodne elemente ksilema i floema. Razlikujemo 3 podrazreda: *Anthocerotidae*, *Marchantiidae* (jetrenjarke, jetrenke) i *Bryidae* (prave mahovine) (Nikoli, 2013.)

Mahovina *P. patens* pripada podrazredu *Bryidae* i posjeduje primitivne provodne elemente hidroide i leptoida (Catarino, 2013.). Izmjena generacija je heteromorfna i heterofazna, odnosno razlikujemo dvije morfološki različite razvojne faze: haploidan gametofit i diploidan sporofit. Dominantna razvojna faza je gametofit (Nikoli, 2013.) na kojem se u odgovarajućim životnim uvjetima (15°C) (Schaefer i sur., 2001.) diferenciraju muški spolni organi (anteridiji) i ženski spolni organi (arhegoniji). U spolnim organima mitotičkim diobama nastaju gamete: pokretni spermatozoidi u anteridijima i nepokretna jajna stanica u arhegonijima (Nikoli, 2013.). U prisustvu vode, pokretni spermatozoidi plivaju do jajne stanice, dolazi do oplodnje i nastaje diploidna zigota. Zigota klije u sporofit, ovisan o gametofitu, u kojem mejozičkim diobama nastaje otprilike 5000 izospora (Schaefer i sur., 2001.) odgovornih za disperziju mahovine (Nikoli, 2013.). Spore kliju u protonemu, mrežastu strukturu stanica kaulonema i kloronema, koja pupanjem formira gametofit građan od filoida, kauloida i rizoida (Schaefer i sur., 2001.).



Slika 1. Kolonije mahovine *Physcomitrella patens* uzgojene na zemlji



Slika 2. Životni ciklus mahovine *Physcomitrella patens* (prilagođeno prema Schaefer i sur., 2001).

3. Interakcije mahovine *Physcomitrella patens* i patogena

3.1. Mahovina *Physcomitrella patens* u interakciji s gljivama

Ispitivana je interakcija mahovine *P. patens* i nekrotrofne gljive *Botrytis cinerea*. Otkriveno je da je mahovina *P. patens* podložna infekciji gljivom *B. cinerea* koja uzrokuje nekrozu protonema, promjenu boje kauloida u smeđu i maceraciju tkiva gametofita. Iako gljiva može inficirati i protonemu i gametofit, protonema je podložnija infekciji (Ponce de León i sur., 2007.). Gljiva penetrira u stanice mahovine pomoću kutinaza i pektinolitičkih enzima kojima degradira biljnu staničnu stijenku. U tkivu mahovine gljiva se razmnožava (Ponce de León i sur., 2012.), ispušta toksine koji doprinose infektivnosti (Oliver i sur., 2009.) i inducira pokretanje obrambenih mehanizama mahovine. Obrambeni mehanizmi mahovine su najčešće regulirani genima koji ekspresiju induciraju signalne molekule (Ponce de León i sur., 2012.).

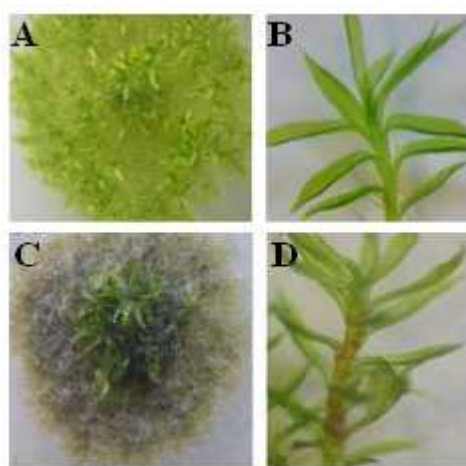
Signalne molekule kojima se promjena koncentracije prati u istraživanjima interakcije mahovine *P. patens* i gljive *B. cinerea* su salicilna kiselina (SA) i jasmonska kiselina (JA). Otkriveno je da infekcija gljivom uzrokuje povećanje koncentracije SA u tkivu mahovine te da SA inducira obrambene gene mahovine. Ispitivano je kako SA djeluje na mahovinu inficiranu gljivom. Otkriveno je da unatoč tretmanu signalnom molekulom SA ne dolazi do redukcije simptoma na mahovini uzrokovanih gljivom. Nakon infekcije gljivom nije primijećena promjena koncentracije JA, ali primijećena je povećana koncentracija molekula koje sudjeluju u sintezi JA i ekspresija gena važnih u biosintetskom putu JA (Ponce de León i sur., 2012.).

Obrambeni mehanizam kojim mahovina *P. patens* nastoji spriječiti širenje gljive *B. cinerea* je ugradnja fenolnih spojeva u biljnu staničnu stijenku. Ugradnja fenolnih spojeva nije dovoljno učinkovita u sprječavanju širenja gljive i infekcija rezultira propadanjem kolonije mahovine. Efikasnija metoda kojom se nastoji spriječiti širenje patogena (prisutna kod kritosjemenjaka) je uvršćivanje stanične stijenke ligninom. Mogućnost sinteze lignina u mahovini je upitna iako infekcija gljivom potiče ekspresiju gena za koje se pretpostavlja da su važni u procesu lignifikacije (Ponce de León i sur., 2012.).

Obrambeni mehanizam koji se također pokreće nakon infekcije protonema *P. patens* gljivom *B. cinerea* je programirana stanična smrt. Nakon infekcije gljivom primijećeno je naglo odumiranje stanica protoneme karakterizirano plazmolizom citoplazme, akumulacijom

autoflorescentnih komponenata (Ponce de León i sur., 2012.), promjenom boje kloroplasta u sme u, propadanjem kloroplasta i klorofila (Ponce de León i sur., 2007.) te stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (Ponce de León i sur., 2012.). Stvaranje ROSova ima višestruku ulogu u obrani od patogena: poticanje programirane stani ne smrti, direktan napad na patogena ili su signalne molekule za vrijeme infekcije. Suprotno, nekrotrofi poput gljive *B. cinerea* mogu u svoju korist inducirati u stanicama doma ina proizvodnju ROSova koji uzrokuju ošte enje i odumiranje stanica doma ina (Oliver i sur., 2009.).

Otkriveno je da još neke fitopatogene gljive, esti patogeni kultiviranih biljaka, poput *Verticillium dahlia*, *Aspergillus niger*, *Sclerotia sclerotorum* i *Fusarium graminearum* mogu inficirati mahovinu *P. patens* (Ponce de León, 2011.).



Slika 3. Simptomi infekcije mahovine *Physcomitrella patens* sporama gljive *Botrytis cinerea* (prilago eno prema Ponce de León i sur., 2007.).

A, B : Zdrava (neinficirana) kolonija mahovine *P. patens*

C: Simptomi infekcije kolonije mahovine gljivom.

D: Promjena boje kauloida u sme u nakon infekcije mahovine gljivom.

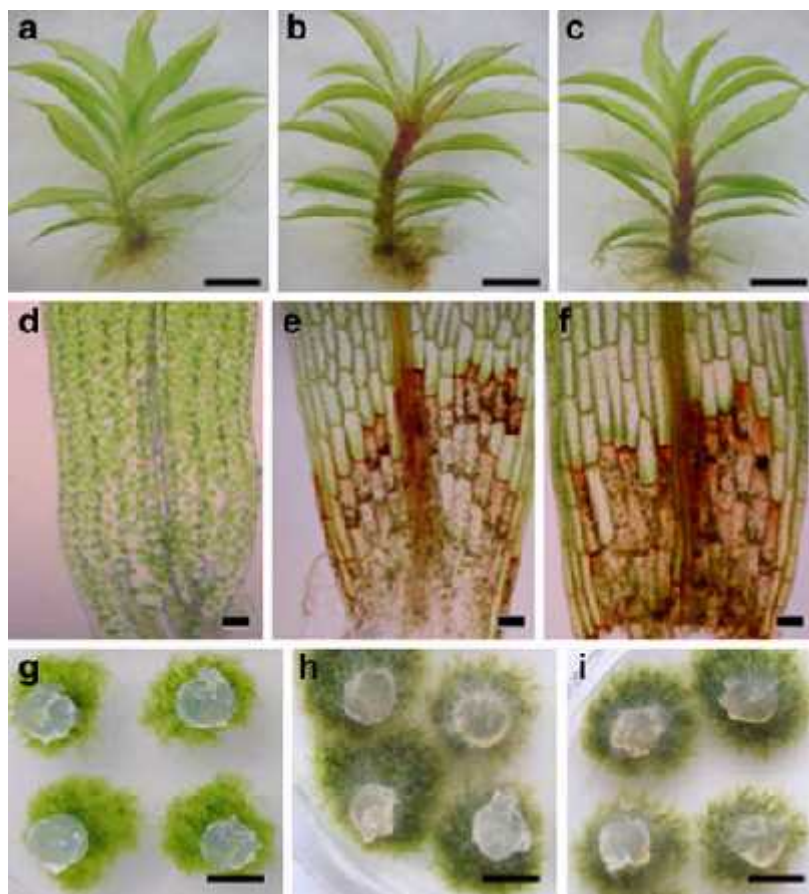
3.2. Mahovina *Physcomitrella patens* u interakciji s oomicetama

Juan Pablo Oliver i suradnici su istraživali interakciju mahovine *P. patens* i oomiceta *Pythium debaryanum* i *Pythium irregulare*. Otkriveno je da je mahovina *P. patens* podložna infekciji oomicetama *P. debaryanum* i *P. irregulare* koje uzrokuju promjenu boje protonema, kauloida, stanica u bazi filoida i središnjeg rebra u sme u te maceraciju tkiva gametofita. Oomicete penetriraju u biljne stanice degradiraju i biljnu stani nu stijenku pomo u pektinaza, hemicelulaza, celulaza i proteinaza. Rani stadij infekcije je karakteriziran pojavom apresorija - strukture pomo u koje se oomiceta prihva a za stanicu doma ina. Nakon penetracije oomiceta u nekoliko stanica mahovine, pojavljuje se struktura nalik haustoriju. Rast hifa oomiceta u mahovini je uglavnom intracelularan iako se kod teških infekcija hife šire izvan stanica inficiraju i ostatak jedinke. Infektivnosti oomiceta doprinose i toksini koje ispuštaju za vrijeme infekcije. Dva dana nakon inokulacije oomiceta hife u potpunosti prekrivaju koloniju mahovine što rezultira odumiranjem kolonije. Oospore, oogoniji i anteridiji oomiceta se mogu javiti jedan dan nakon infekcije, no naj eš e se pojavljuju dva dana nakon infekcije. Infekcija oomicetama inducira pokretanje obrambenih mehanizama mahovine (Oliver i sur., 2009.).

Ispitivana je promjena koncentracije signalnih molekula. Otkriveno je da infekcija oomicetama ne uzrokuje pove anje koncentracije SA, ali uzrokuje pove anje koncentracije JA (Oliver i sur., 2009.), pove anje koncentracije molekula koje sudjeluju u sintezi JA i inducira ekspresiju gena važnih u biosintetskom putu JA (Ponce de León i sur., 2012.).

Rani odgovor na infekciju kojim mahovina nastoji sprije iti daljnju penetraciju oomiceta u stanice je ugradnja fenolnih spojeva i kaloze u biljnu stani nu stijenku. Iako oomicete induciraju obranu u vrš ivanju stani ne stijenke, ugradnja fenolnih spojeva i kaloze nije dovoljna u sprje avanju daljnje infekcije (Oliver i sur., 2009.).

Infekcija mahovine *P. patens* oomicetama *P. debaryanum* i *P. irregulare* uzrokuje odumiranje stanica mahovine i proizvodnju ROSova u tkivu doma ina. Kloroplast može poslužiti kao glavni izvor ROSova nakon infekcije patogenima, stoga je ispitano proizvode li se ROSovi u kloroplastima mahovine *P. patens* nakon infekcije oomicetama. Nakon infekcije oomicetama u kloroplastu mahovine nisu prona eni ROSovi, ali je primije eno pomicanje kloroplasta u smjeru infekcije (Oliver i sur., 2009.).



Slika 4. Simptomi infekcije mahovine *Physcomitrella patens* oomicetama *Pythium debaryanum* i *Pythium irregulare* (prilagođeno prema Oliver i sur., 2009.).

a, d, g: Kontrolne mahovine tretirane istim „potato dextrose agar“ (PDA) ne pokazuje simptome infekcije.

b: Simptom promjene boje kauloida u smeđu nakon infekcije mahovine oomicetom *P. debaryanum*.

c: Simptom promjene boje kauloida u smeđu nakon infekcije mahovine oomicetom *P. irregulare*.

e: Simptom promjene boje stanica u bazi filoida i središnjeg rebra u smeđu nakon infekcije mahovine oomicetom *P. debaryanum*.

f: Simptom promjene boje stanica u bazi filoida i središnjeg rebra u smeđu nakon infekcije mahovine oomicetom *P. irregulare*.

h: Simptom infekcije kolonije mahovine oomicetom *P. debaryanum*.

i: Simptomi infekcije kolonije mahovine oomicetom *P. irregulare*.

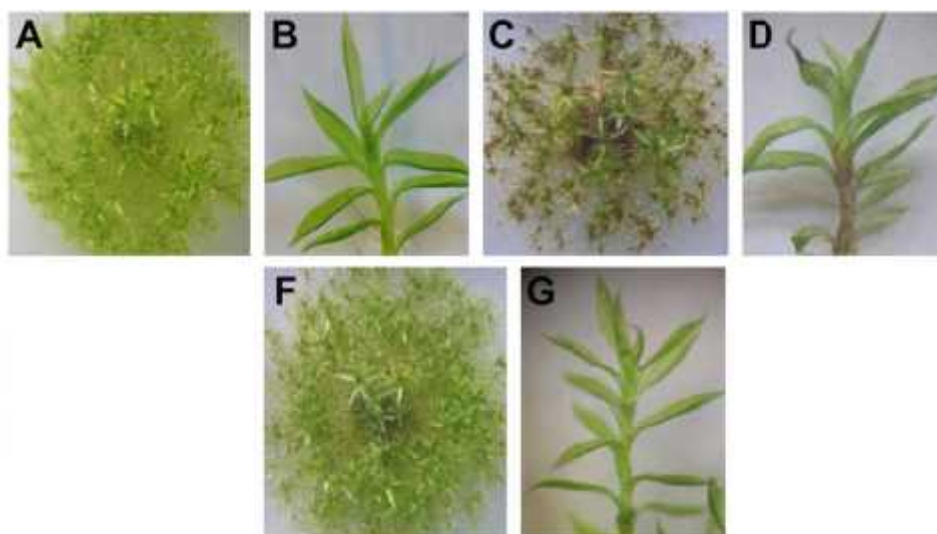
3.3. Mahovina *Physcomitrella patens* u interakciji s bakterijama

Znanstvenici su istraživali interakciju mahovine *P. patens* i bakterije *Pectobacterium carotovorum*. Pojedini sojevi bakterije mogu proizvoditi harpine, malene glicinom bogate proteine stabilne pri visokoj temperaturi i niskom pH. Harpini induciraju biljne obrambene mehanizme, stoga su istraživanja provedena s dva soja bakterije: sojem koji proizvodi harpine *P. c. carotovorum_{SCC1}* i sojem koji ne proizvodi harpine *P. c. carotovorum_{SCC3193}*. Otkriveno je da je mahovina *P. patens* podložna infekciji oba sojevima bakterije *P. c. carotovorum*. Bakterija degradira biljnu staničnu stijenku proteazama, celulazama i pektinazama. Simptomi koji se javljaju, dva dana nakon inokulacije oba soja bakterije je maceracija protonema. Soj bakterije koji proizvodi harpine jače oštećuje protonema i uzrokuje promjenu boje protonema u smeđu. Nakon inokulacije oba soja u koloniju mahovine ne dolazi do maceracije tkiva gametofita, ali soj koji proizvodi harpine uzrokuje promjenu boje kauloida u smeđu (Ponce de León i sur., 2007.).

Infekcija ovom bakterijom inducira pokretanje obrambenih mehanizama mahovine (Ponce de León i sur., 2012.).

Kolonije mahovine *P. patens* su uzgajane na hranjivim podlogama u koje je dodana SA kako bi se otkrilo povećava li SA otpornost na bakteriju *P. c. carotovorum_{SCC1}*. Simptomi infekcije uzrokovani bakterijom na mahovinama koje su rasle na hranjivim podlogama u koje je dodana SA bili su znatno reducirani (Andersson i sur., 2005.). Ispitivana je promjena koncentracije JA u tkivu mahovine *P. patens* nakon infekcije bakterijom *P. c. carotovorum_{SCC1}*. Otkriveno je da infekcija bakterijom ne utječe na koncentraciju JA, ali uzrokuje povećanu koncentraciju molekula u sintetskom putu JA (Ponce de León i sur., 2012.) i inducira ekspresiju gena važnih u sintezi JA (Oliver i sur., 2009.).

Nakon infekcije protonema *P. patens* bakterijom *P. c. carotovorum_{SCC1}*, harpin pozitivnim sojem, primijećen je velik broj odumrlih biljnih stanica. Infekcije protoneme harpin negativnim sojem *P. c. carotovorum_{SCC3193}* primijećen je maleni broj odumrlih biljnih stanica. Infekcija protoneme harpin pozitivnim sojem bakterije uzrokuje plazmolizu citoplazme, promjenu boje kloroplasta u smeđu i akumulaciju autofluorescentnih komponenata. Infekcija protoneme harpin negativnim sojem bakterije ne uzrokuje spomenute promjene. Spomenute stanične promjene ukazuju da je odumiranje stanica mahovine povezano s procesom programirane stanične smrti (Ponce de León i sur., 2007.).



Slika 5. Simptomi infekcije mahovine *Physcomitrella patens* bakterijom *Pectobacterium carotovorum* (prilagođeno prema Ponce de León i sur., 2007.).

A, B: Kontrolne mahovine tretirane istim „Luria-Bertani“ (LB) medijem ne pokazuje simptome infekcije.

C: Simptom infekcije kolonije mahovine bakterijom *P. c. carotovorum*_{SCC1}.

D: Promjena boje kauloida u smeđu nakon infekcije mahovine bakterijom *P. c. carotovorum*_{SCC1}.

F, G: Nakon infekcije mahovine bakterijom *P. c. carotovorum*_{SCC3193} ne dolazi do pojave simptoma na mahovini.

3.4. Mahovina *Physcomitrella patens* u interakciji s virusima

Ispitivana je podložnost mahovine *P. patens* infekciji virusom pjegavosti i venušarice (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*). Otkriveno je da je mahovina *P. patens* podložna infekciji TSWV. Usporedivan je broj inficiranih jedinki mahovine i broj inficiranih jedinki kritosjemenja a te je ustavljeno da je broj inficiranih jedinki mahovine manji u odnosu na broj inficiranih jedinki kritosjemenja a. Nakon infekcije mahovine virusom pronađena su dva virusna proteina: strukturni protein i „movement“ proteina. Još uvijek nije poznato širi li se virus u mahovini diobama inficiranih stanica ili se širi između stanica filoida i kroz kauloid na veću udaljenosti (Hühns i sur. 2003.).

3.5. Metode korištene u istraživanjima interakcije mahovine *Physcomitrella patens* i patogeni (gljiva, oomiceta i bakterija)

U istraživanjima interakcije mahovine *P. patens* i patogeni uključuju i gljivu *B. cinerea*, oomicete *P. debaryanum* i *P. irregulare* i bakteriju *P. c. carotovorum* mahovina je uzgajana na agaru u kontroliranim uvjetima (temperatura 22°C, fotoperiod 16h). Mahovina je uzgajana 3 tjedna. Gljiva *B. cinerea* i oomicete *P. debaryanum* i *P. irregulare* su kultivirane na 24g/L PDA na temperaturi 22°C (Ponce de León i sur., 2012.). Gljiva je inokulirana u mahovinu špricanjem mahovine sporama gljive (Ponce de León i sur., 2007.). Znanstvenici su inokulirali oomicete u kolonije mahovine stavljajući ih na PDA koji je sadržavao micelij oomiceta na kolonije mahovine bez dodirivanja agara na kojem su mahovine rasle (Oliver i sur., 2009.). Bakterija *P. c. carotovorum* je kultivirana na LB mediju na temperaturi 28°C i inokulirana špricanjem mahovine bakterijskim stanicama. Modifikacije stanične stijenke su vizualizirane bojama „safranin-O“ i „toluidine blue“. Korišteni su fluoescencijski mikroskop i mikroskop sa svijetlim vidnim poljem. Unutarstanična proizvodnja ROS-ova je detektirana inkubacijom mahovine u „2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate“ (H₂DCFDA). Za detekciju odumrlih stanica mahovine korištena je boja „Evans blue“ (Ponce de León i sur., 2012.).

4. Zaključak

Na temelju provedenih istraživanja može se zaključiti da je mahovina *P. patens* podložna infekcijama gljivom *B. cinerea*, oomicetama *P. debaryanum* i *P. irregulare* i bakterijom *P. c. carotovorum*. Spomenuti patogeni u mahovini uzrokuju pojavu simptoma kao odraza infekcije i induciraju pokretanje obrambenih mehanizama. Ispitivana je interakcija mahovine s dva soja bakterije *P. c. carotovorum*: sojem koji proizvodi harpine *P. c. carotovorum*_{SCC1} i sojem koji ne proizvodi harpine *P. c. carotovorum*_{SCC3193}. Soj koji proizvodi harpine jače oštećuje protonemu i inducira obrambene mehanizme mahovine, dok soj koji ne proizvodi harpine uglavnom ne inducira obrambene mehanizme mahovine. Iz priloženog se može zaključiti da su upravo harpini elicitori bakterijske zaraze, odnosno da mahovina za vrijeme infekcije bakterijom prepoznaje upravo harpine i pokreće obrambene mehanizme kojima nastoji zaustaviti infekciju (Ponce de León i sur., 2007.).

U istraživanjima je dokazano da su signalne molekule uključene u obrambene puteve i ekspresiju obrambenih gena u mahovini te da su inducirane gljivama, oomicetama i bakterijama. Nakon infekcije gljivom povećava se koncentracija signalne molekule SA koja potom inducira ekspresiju obrambenih gena mahovine, a infekcija oomicetama ne utječe na koncentraciju SA. Nakon infekcije bakterijom na mahovini tretiranoj SA primijećena je redukcija simptoma, a nakon infekcije gljivom na mahovini tretiranoj SA ne dolazi do promjene simptoma zaraze. Iz priloženog se može zaključiti da je SA signalna molekula uključena u obranu od gljivične infekcije, no SA ne može zaustaviti infekciju gljivom (Ponce de León i sur., 2012.). Suprotno, obrambeni mehanizmi aktivirani SA mogu zaustaviti bakterijsku infekciju (Andersson i sur., 2005.). Infekcija gljivom i bakterijom ne utječe na promjenu koncentracije JA dok infekcija oomicetama povećava koncentraciju JA. Zaključujemo da različiti patogeni interferiraju sa različitim signalnim molekulama u mahovini *P. patens*.

Rani odgovor mahovine na infekciju gljivom i oomicetama uključuje ugradnju fenolnih spojeva u stanišnu stijenu čime se nastoji spriječiti penetracija i širenje patogena. Ugradnja fenolnih spojeva nije dovoljno učinkovita u obrani od gljive i oomiceta te u oba slučaja infekcija dovodi do odumiranja kolonije mahovine. Lignifikacija je efikasnija metoda u obrani od patogena, postojanje lignina u mahovini još nije dokazano, stoga se može pretpostaviti da manjak lignina rezultira velikom podložnošću mahovine gljivama i oomicetama.

Odumiranje stanica je primijećeno nakon infekcije gljivom, oomicetama i bakterijom. Odumiranje stanica je karakterizirano specifičnim promjenama u stanicama koje ukazuju na to da je odumiranje rezultat aktivacije obrambenog mehanizma zvanog programirana stanična smrt. Nakon infekcije gljivom i oomicetama dolazi do akumulacije ROS-ova. ROS-ovi mogu sudjelovati u obrani mahovine od patogena, no mogu i koristiti patogenima oštećenu i stanice mahovine. Infekcija oomicetama uzrokuje pomicanje kloroplasta prema inficiranim stanicama. Kloroplast može biti glavni izvor ROS-ova za vrijeme infekcije patogenima, no nakon infekcije oomicetama u kloroplastima nisu pronađeni ROS-ovi. Propadanje kloroplasta i oslobađanje fotoaktivnog klorofila je važno u zaštiti mahovine od velike količine ROS-ova koji mogu oštetiti stanice mahovine. Zaključujem da je kloroplast važan organel u obrani mahovine od oomiceta. Pomicanje kloroplasta prema infekciji povezujem s ulogom fotoaktivnog klorofila u obrani mahovine od ROS-ova koji nastaju nakon infekcije oomicetama. Također smatram da programirana stanična smrt pogoduje infekciji nekrotrofnih patogena jer se upravo nekrotrofni patogeni hrane odumrlim biljnim stanicama.

Mahovina *P. patens* je podložna infekciji virusom pjegavosti i venusa rajice. U mahovini su pronađena dva virusna proteina na temelju čega se pretpostavlja daje u tkivu mahovine virusni genom u potpunosti prepisan i repliciran. Prepisivanje i replikacija virusnog genoma može rezultirati sklapanjem novih virusnih čestica. Još uvijek nije poznato kako se virus širi inficiranom mahovinom. Moguće je da su hidroidi i leptoidi, primitivni provodni elementi mahovine važni u širenju virusa gametofitom mahovine.

Budući da iz navedenih istraživanja možemo iščitati da je mahovina *P. patens* podložna infekcijama gljivama, bakterijama, oomicetama i virusima te da na spomenute infekcije odgovara pokretanjem obrambenih mehanizama zaključujem da mahovina može poslužiti u istraživanjima interakcije biljka – patogen. Mahovine su evolucijska poveznica između zelenih algi i kritosjemenjaka, a obrambeni mehanizmi koji se pokreću u mahovini su slični upravo obrambenim mehanizmima kritosjemenjaka te se interakcija biljka – patogen može proučavati na evolucijskoj razini. Jednostavan uzgoj *in vitro*, jednostavna građa i haploidan gametofit također idu u prilog razmatranju mahovine *P. patens* kao modelnog organizma.

5. Literatura

- Andersson, R.A., Akita, M., Pirhonen, M., Gammelgård, E., Valkonen, J.P.T. (2005.), *Moss-Erwinia pathosystem reveals possible similarities in pathogenesis and pathogen defense in vascular and nonvascular plants*. Journal of General Plant Pathology 71:23–28
- Catarino, R. M. (2013.) *Dissecting the functional role of PTEN proteins from Physcomitrella patens*. Disertacija. Lisabon: Faculdade de Ciências
- Hühns, S., Bauer, C., Buhlmann, S., Heinze, C., von Barger, S., Paape, M., Kellmann, J.W. (2003.) *Tomato spotted wilt virus (TSWV) infection of Physcomitrella patens gametophores*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75:183–187
- Nikoli , T. (2013.) Sistematska botanika. 1. izd. Zagreb: Alfa d.d
- Oliver, J.P., Castro, A., Gaggero, C., Cascón, T., Schmelz, E.A., Castresana, C., Ponce de León, I. (2009.) *Pythium infection activates conserved plant defense responses in mosses*. Planta 230:569–579
- Ponce de León, I., Schmelz, E.A., Gaggero, C., Castro, A., Álvarez, A., Montesano, M. (2012.) *Physcomitrella patens activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon Botrytis cinerea infection*. Molecular plant pathology 13(8):960-74
- Ponce de León, I. (2011.) *The Moss Physcomitrella patens as a Model System to Study Interactions between Plants and Phytopathogenic Fungi and Oomycetes*. Journal of Pathogens ID 719873:6.
- Ponce de León, I., Oliver, J.P., Castro, A., Gaggero, C., Bentancor, M., Vidal, S., (2007.) *Erwinia carotovora elicitors and Botrytis cinerea activate defense responses in Physcomitrella patens*. BMC Plant Biology 8:52

Schaefer, D.G., Zrýd, J.P., (2001.) *The Moss Physcomitrella patens, Now and Then*. Plant Physiology 127:1430-1438

6. Sažetak

U biološkim se istraživanjima često koriste modelni organizmi. Mahovina *P. patens* razmatra se kao novi modelni organizam u istraživanjima interakcije biljka – patogen. Cilj ovog seminarskog rada je opisati interakciju mahovine i pojedinih patogena (gljiva *B. cinerea*, oomicete *P. debaryanum* i *P. irregulare*, bakterija *P. c. carotovorum* i virus pjegavosti i venu a raj ice), usporediti proces infekcije različitih patogena i obrambene mehanizme koji se aktiviraju u mahovini nakon infekcije. Otkriveno je da spomenuti patogeni mogu inficirati mahovinu te pokrenuti obrambene mehanizme mahovine. Obrambeni mehanizmi su često inducirani signalnim molekulama poput SA i JA. Različiti patogeni različito interferiraju sa signalnim molekulama u mahovini *P. patens*. Rani odgovor na infekciju gljivom i oomicetama, kojim se nastoji spriječiti širenje gljive i oomiceta je akumulacija fenolnih spojeva u staničnu stijenku mahovine. Ugradnja fenolnih spojeva nije dovoljno učinkovita u sprežavanju infekciju. Druga metoda obrane od gljive, bakterije i oomiceta je programirana stanična smrt mahovine koja je karakterizirana odumiranjem stanica i karakterističnim staničnim promjenama. Infekcije gljivom i oomicetama uzrokuje proizvodnju ROS.

Mahovina *P. patens* je podložna infekciji virusom pjegavosti i venu a raj ice te su u tkivu mahovine pronađena dva virusna proteina. Pronalazak proteina pretpostavlja da je u tkivu mahovine u potpunosti repliciran i prepisan genom virusa što može rezultirati sklapanjem novih virusnih čestica.

7. Summary

In biological research we often use model organisms. Moss *P. patens* is considered as a new model organism in research on plant – pathogen interactions. Purpose of this seminar is to describe the interactions between moss and certain pathogens (fungus *B. cinerea*, oomycetes *P. debaryanum* and *P. irregulare*, bacteria *P. c. carotovorum* and Tomato spotted wilt virus), to compare the process of infection of various pathogens and defense mechanisms that are activated in moss after infection. It has been discovered that these pathogens can infect moss and induce defense mechanisms in moss. Defense mechanisms are often induced by signal molecules such as SA and JA. Different pathogens interfere with different signal molecules in moss *P. patens*. Early response to infection by fungus and oomycetes, which aims to prevent the spread of fungus and oomycetes, is incorporation of phenolic compounds in the mosses cell wall. Incorporation of phenolic compounds is not enough efficient to stop

infection. Another method of defense against fungus, bacteria and oomycetes is programmed cell death in moss which is characterized by cell death and characteristic cell changes. Infection with fungus and Oomycetes causes the production of ROS.

Moss *P. Patens* is subject for *Tomato spotted wilt virus* infection. Two viral proteins were found in moss tissue after inoculation of virus. The discovery of the protein assumed that viral genome was replicated and transcribed which can direct assembly of new viral particles.